

Zur Bestimmung somatischer Milchzellen mit der
optischen Partikelzählung im Durchflußverfahren
unter Berücksichtigung des mikroskopischen
und elektronischen Zählverfahrens

Karl Stelzer

1973

Aus dem Bereich Hygiene und Technologie der Lebensmittel
tierischen Ursprungs der Universität München
- Tierärztliche Fakultät -

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h.c. L. Kotter
und Prof. Dr. G. Terplan

Zur Bestimmung somatischer Milchzellen mit der
optischen Partikelzählung im Durchflußverfahren
unter Berücksichtigung des mikroskopischen
und elektronischen Zählverfahrens

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Karl Stelzer

aus Landau a. d. Isar

München 1973

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme
Referent: Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent: Prof. Dr. K. Walser

Tag der Promotion: 27. Juli 1973



1. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...
11. ...
12. ...
13. ...
14. ...
15. ...
16. ...
17. ...
18. ...
19. ...
20. ...
21. ...
22. ...
23. ...
24. ...
25. ...
26. ...
27. ...
28. ...
29. ...
30. ...
31. ...
32. ...
33. ...
34. ...
35. ...
36. ...
37. ...
38. ...
39. ...
40. ...
41. ...
42. ...
43. ...
44. ...
45. ...
46. ...
47. ...
48. ...
49. ...
50. ...
51. ...
52. ...
53. ...
54. ...
55. ...
56. ...
57. ...
58. ...
59. ...
60. ...
61. ...
62. ...
63. ...
64. ...
65. ...
66. ...
67. ...
68. ...
69. ...
70. ...
71. ...
72. ...
73. ...
74. ...
75. ...
76. ...
77. ...
78. ...
79. ...
80. ...
81. ...
82. ...
83. ...
84. ...
85. ...
86. ...
87. ...
88. ...
89. ...
90. ...
91. ...
92. ...
93. ...
94. ...
95. ...
96. ...
97. ...
98. ...
99. ...
100. ...

MEINER FRAU
gewidmet

GLIEDERUNG

1. EINLEITUNG
2. SCHRIFTTUM
 - 2.1. Beziehung zwischen dem Gehalt der Milch an somatischen Zellen, Eutergesundheit und Milchsekretion
 - 2.2. Direkte Methoden zur Bestimmung des Milchzellgehaltes
 - 2.2.1. Mikroskopische Zählverfahren
 - 2.2.1.1. Prescott und Breed
 - 2.2.1.2. Sedimentaustrich
 - 2.2.1.3. Kammerzählverfahren
 - 2.2.2. Elektronische Partikelzählverfahren (EPZ)
 - 2.2.3. Optische Partikelzählung (OPZ) im Durchflußverfahren
 - 2.3. Indirekte Methoden zur Bestimmung des Milchzellgehaltes
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN
 - 3.1. Entnahme der Proben
 - 3.2. Untersuchungsmethodik
 - 3.2.1. Mikroskopisches Zählverfahren (MZ) nach Prescott und Breed
 - 3.2.2. Elektronisches Partikelzählverfahren
 - 3.2.3. Optische Partikelzählung im Durchflußverfahren
 - 3.3. Versuche zur Ermittlung geeigneter Reagenzien zur optischen Partikelzählung im Durchflußverfahren
 - 3.4. Ermittlung des Aufbereitungs- und Gerätefehlers
 - 3.5. Korrelationen zwischen den gebräuchlichsten Zellzählverfahren (MZ, EPZ, OPZ)
4. DISKUSSION
5. ZUSAMMENFASSUNG
6. SCHRIFTTUMSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

Der Gehalt somatischer Zellen in Milch ist ein **meßbares** Kriterium für den Gesundheitszustand der Milchdrüse. Die derzeit gebräuchlichsten Methoden zur Quantifizierung sind das elektronische Partikelzählverfahren (EPZ) in der Modifikation nach ZEIDLER, TOLLE und HEESCHEN (1968) und das direkte mikroskopische Zählverfahren (MZ) nach PRESCOTT und BREED (1910).

In letzter Zeit wird die optische Partikelzählung (OPZ) im Durchflußverfahren als besonders zuverlässiges und rationelles Verfahren empfohlen.

Mir wurde die Aufgabe gestellt, die Eignung dieser Methode für Routineuntersuchungen im direkten Vergleich zum EPZ und MZ nach PRESCOTT und BREED zu überprüfen.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Beziehung zwischen dem Gehalt der Milch an somatischen Zellen, Eutergesundheit und Milchsekretion

Art und Menge der im Sekret einer Milchdrüse vorhandenen Zellen unterliegen beträchtlichen Schwankungen, die durch Rassezugehörigkeit, Laktationsphase, verschiedene individuelle und umweltbedingte Faktoren, vor allem durch den Eutergesundheitszustand verursacht werden. HAUKE (1961) und KAISER (1965) veröffentlichten in Zusammenstellungen unterschiedliche Zellzahlen verschiedener Autoren als Grenzwerte normaler Sekretion der Milchdrüse. Übereinstimmend bewerten jedoch alle Untersucher eine Erhöhung des Zellgehaltes als Ausdruck einer Irritation der Drüse. Die Intensität des Reizes soll in direkter Beziehung zur Zellzahlerhöhung stehen.

Der internationale Milchwirtschaftsverband (IMV) empfahl 1966 für die Beurteilung von Viertelgemelksproben aus dem Anfangsgemelk normal laktierender Kühe einen Grenzwert von 500.000 Zellen/ml Milch. Dieser Grenzwert zwischen normaler und gestörter Laktation wurde seither von vielen Untersuchern überprüft.

TOLLE (1970) stellte fest, daß bei Eutervierteln ab einem Zellzahlgehalt von 200.000 bis 500.000/ml Milch die prozentuale Häufigkeit bakteriologisch positiver Befunde einen deutlichen Anstieg zeigt. TERPLAN und ZAADHOF (1969) fanden, daß in 54,8 % aus Großbeständen stammender Viertelgemelksproben mit *Staph. aureus* der Zellgehalt erhöht war, während der entsprechende Prozentsatz für *Staph. aureus* - freie Proben nur 16,8 % betrug. Auch GUTHY et. al. (1970) berichten von einer signifikanten Korrelation zwischen dem elektronisch ermittelten Zellgehalt und der Zahl kolonienbildender Einheiten von *Staph. aureus*.

Anhand histopathologischer Untersuchungen von Eutern ermittelte HESS (1969), daß Milchprobenbefunde mit Zellzahlen über 500.000/ml, unabhängig vom bakteriologischen Befund, in 96 % bis 98 % der Fälle mit histologischen Veränderungen des Eutergewebes verbunden sind. Auf Grund dieser Ergebnisse bewertet der Autor die Zellzahlbestimmung als ein wesentliches Hilfsmittel zur routinemäßigen Erfassung von Eutergesundheitsstörungen. Auch GUTHY et. al. (1970) und BAUMGARTNER und HUBER (1971) bezeichnen die Anzahl somatischer Zellen in Milch als ein exakt quantifizierbares Kriterium für den Gesundheits- und Funktionszustand der Milchdrüse. TOLLE (1970) sieht einen geradezu gesetzmäßigen Zusammenhang

zwischen Zellzahl, Erkrankungsgrad und Milchleistung des Euters. REICH-MUTH et. al. (1970) bestätigen diese Feststellung und geben bei Überschreitung des zytologischen Grenzwertes von 500.000 Zellen/ml Milch im Anfangsviertelgemelk einen Rückgang der Milchleistung erkrankter Euterviertel von durchschnittlich 17,1 % an. Bei Berücksichtigung einer Erkrankungshäufigkeit von 24,7 % aller untersuchten Euterviertel ergab sich eine Verminderung des Gesamtmilchertrages von 4,3 %. THORNTEN (1971) ermittelte bei einem Jahresdurchschnitt von 250.000 bis 500.000 Zellen pro ml Tankmilch einen Produktionsverlust von 3,9 %. Bei Anstieg des Zellzahldurchschnittes auf über 1 Million tritt nach diesem Untersucher eine Erhöhung des Verlustes bis zu 18 % ein. BRANDER (1971) ermittelte den jährlichen Milchverlust pro Kuh in den überprüften Herden bei 250.000 bis 500.000 Zellen pro ml Bestandsmilch mit 190 Liter, bei 500.000 bis 750.000 Zellen/ml mit 336 Litern, bei 750.000 bis 1.000.000 Zellen/ml mit 767 Liter und bei mehr als einer Million Zellen/ml mit 894 Liter.

TOLLE (1971) schreibt in den Grundlagen für eine systematische Mastitis-Bekämpfung: "Das Eindringen pathogener Mikroorganismen in das Parenchym der Milchdrüse löst eine Immigration von Phagozyten aus den Kapillaren bzw. dem perialveolären Interstitium aus, die auf jede Reizursache hin - Wachstumsvorgängen vergleichbar - exponentiell erfolgt. Entsprechend dieser Theorie sind bestimmte Milchinhaltsstoffe und die Anzahl somatischer Zellen eng korreliert." Er ermittelte, daß mit steigendem Zellgehalt schon sehr frühzeitig eine Minderung der Milchleistung einsetzt und bezeichnet die erhöhte Anzahl somatischer Zellen in Milch als einen "empfindlichen Indikator für veränderte chemische Zusammensetzung des Sekretes, bzw. für eine verringerte Milchleistung."

GLAWISCHNIG et. al. (1971) ermittelten in 1050 untersuchten Betrieben die Beziehung zwischen der bakteriologischen Viertelgemelkprobenuntersuchung und der zytologischen Untersuchung von Kannenmilchproben bei Zugrundelegung eines Grenzwertes von 500.000 Zellen/ml. Erst nach Herabsetzung der Zellzahlgrenze für Kannenmilchproben auf 100.000 Zellen/ml Milch konnten sie 97,5 % der infizierten Betriebe auch durch die zytologische Untersuchung mittels EPZ erfassen.

WESTGARTH (1971) stellt, wegen der noch zu großen Irrtumsmöglichkeit in Bezug auf den Infektionszustand einer Herde, das Ergebnis der Zellzählung als Kriterium für die Qualitätsbezahlung in Frage.

2.2. Direkte Methoden zur Bestimmung des Milchzellgehaltes

2.2.1. Mikroskopische Zählverfahren

2.2.1.1. PRESCOTT und BREED

Zur direkten Bestimmung des Milchzellgehaltes findet u. a. das MZ nach PRESCOTT und BREED (1910) Anwendung. Das Prinzip der Methode besteht in der gleichmäßigen Verteilung einer definierten Milchmenge (0,01 ml) auf eine Fläche von 1 cm^2 eines Objektträgers. Nach Fixieren und Färben des Ausstriches erfolgt die mikroskopische Auswertung. PRESCOTT und BREED geben bei Auszählung von 2×10 Gesichtsfeldern einen durchschnittlichen Fehler von 14,5 % an, der bei Zellzahlwerten von weniger als 250.000 pro ml Milch zum Teil höher liegt. DIERNHOFER (1950) schreibt: "Der Vorteil dieser Methode ist ihre scheinbare Exaktheit. In Wirklichkeit hat diese aber auch ihre Grenzen." LEIDL, SCHALM und LÜPS (1961) kommen bei ihren Untersuchungen über die Fehlermöglichkeiten der Zellzahlbestimmung nach PRESCOTT und BREED (Färbung: Der bei Zimmertemperatur luftgetrocknete Ausstrich wird 5 Min. in Xylol entfettet, nach Abtrocknen 5 Min. in absolutem Alkohol fixiert, wieder getrocknet und 5 - 10 Sekunden in einer Farblösung nach BROADHURST gefärbt) zu folgendem Ergebnis:

- "1. Die Entnahme von 0,01 ml Milch kann mit Pipetten oder einfacher, schneller und mit ausreichender Genauigkeit mit standardisierten Ösen erfolgen.
2. Beim Ausstrich von 0,01 ml Milch auf eine Fläche von 1 cm^2 sind die Zellen im Ausstrich nicht gleichmäßig verteilt.
In der Mitte befinden sich, unabhängig von Zellzahl und Zellart, 1,5 bis 1,7 mal soviel Zellen wie in den Randgebieten. Es wird daher empfohlen, die zu zählenden Gesichtsfelder im Verhältnis 3 : 4 : 3 von einem Randgebiet des Ausstriches (3) über die Mitte (4) zum anderen Randgebiet (3) zu verteilen.
3. Die wiederholte Probenentnahme dieser relativ kleinen Mengen von 0,01 ml Milch ergab nach gutem Durchschütteln immer ein für die untersuchte Milch repräsentatives Ergebnis der Zellzahl.

4. Die Genauigkeit der Zellzahlbestimmung ist in geringem, die Differenzierung und damit die Zählung der polymorphkernigen Leukozyten in vermehrtem Maße von der Erfahrung des Untersuchers abhängig.
5. Die Fehlergrenze der Zellzahlbestimmung nach PRESCOTT und BREED nimmt mit steigendem Zellgehalt zu, erlaubt aber eine Verwendung dieser Methode für Vergleichsuntersuchungen und zur Beurteilung der Milch.“

KALLER (1964), der diese Methode der Ermittlung von aseptischen Mastitiden zugrunde legte, bezeichnet es im Grunde genommen als falsch, bei der Zellzählmethode nach PRESCOTT und BREED von einer direkten Methode zu sprechen, da aus 0,01 ml Milch immer nur ein kleiner Ausschnitt auf Zellen durchmustert wird.

BAUMGARTNER (1965) stellte wie LEIDL, SCHALM und LÜPS fest, daß sich während des Trocknens des Ausstriches eine deutliche Ansammlung der Zellen zur Mitte hin ergibt. Um eine gleichmäßigere Verteilung zu erreichen, empfiehlt er, auf eine runde, anstelle auf eine quadratische Fläche auszustreichen. Um die trotzdem zur Mitte hin auftretende Konzentration zu berücksichtigen, wird empfohlen, die Blickfelder entlang der mittleren Sehne in gleichmäßigen Abständen auszuzählen. Die ungleiche Zellverteilung kann auch bei Auszählung entlang des Durchmessers berücksichtigt werden, wenn mit einem Korrekturfaktor von 0,8 der systematische Fehler ausgeschaltet wird. PAAPE, TUCKER und HAFS (1965) stellten bei mehrmaligem Auszählen derselben Probe eine Abweichung von durchschnittlich 19 % fest. Sie heben besonders den subjektiven Einfluß des Untersuchers und die Technik des Ausstriches auf das Ergebnis hervor.

2.2.1.2. Sedimentausstrich

Der Ermittlung des Gesundheitszustandes der Milchdrüse wird heute im allgemeinen die quantitative Erfassung des Zellgehaltes in Verbindung mit der kulturellen Untersuchung von Viertelgemelksproben zugrunde gelegt. Die Beurteilung wird dabei häufig nach den Empfehlungen des IMV (1966) vorgenommen. Zur Vermeidung von Fehldiagnosen empfehlen unter anderen SCHULZE - PETZOLD zit. nach HAUKE (1961) und TERPLAN (1969, 1971) neben der quantitativen auch eine qualitative Beurteilung des Zellgehaltes, insbesondere hinsichtlich der Befunde "latente Infektion" mit *Staph. aureus* und "subklinische *Staph. -Mastitis*". Eine dieser Forderung entsprechende Methode ist die qualitative und semiquantitative Auswertung

eines Ausstriches aus dem Sediment von 10 ml, bei 3.000 Umdrehungen, 15 Min. abzentrifugierter Viertelgemelksprobe.

2.2.1.3. Kammerzählverfahren

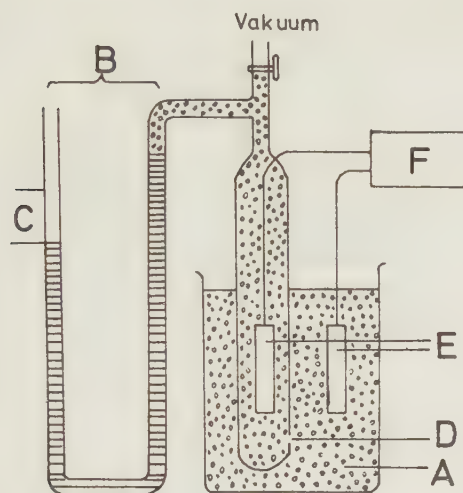
Das von SEELEMANN und OBIGER (1962) sowie von SEELEMANN und MEYER (1963) beschriebene Kammerzählverfahren findet infolge des beträchtlichen Präparationsaufwandes und der geringen Probenfrequenz nur sehr beschränkt Anwendung.

2.2.2. Elektronische Partikelzählverfahren (EPZ)

Das EPZ ermöglicht die Bestimmung von Anzahl und Größe geformter Teilchen in Milch. Das am häufigsten angewandte Gerät zum EPZ ist der Coulter Counter (Abb. 1). Die in einer definierten Menge (C) eines Elektrolyten suspendierten Leukozyten werden durch eine Kapillaröffnung (D) transportiert und bewirken dabei in einem Gleichstromspannungsfeld eine ihrem Volumen (Diskriminator) und ihrer Anzahl proportionale Widerstandsänderung, die elektronisch erfaßt und registriert wird.

Abbildung 1

Schema des Coulter - Counters



- A Leukozytensuspension
- B Manometer
- C Höhe der Säule des zu messenden Volumens
- D Kapillaröffnung ($\phi = 100\mu$)
- E Elektroden
- F Registrierung der Widerstandsänderungen

Das Hauptproblem der Zählung somatischer Zellen in Milch besteht nach TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN (1966) darin, selektiv nur die Zellfraktion zu erfassen und die, den Größenbereich der Zellen überlappenden 2 bis 6 Milliarden Fettkügelchen/ml Milch beim Zählvorgang zu eliminieren. Nach CULLEN (1965), PHIPPS und NEWBOULD (1965, 1966) und READ, REYES, BRADSHAW und PELLER (1966) kann das Fett durch Zentrifugieren eliminiert und der Zellgehalt aus dem resuspendierten Milchsediment bestimmt werden. TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN (1966) beurteilten dieses Verfahren als zu aufwendig und stimmen mit PRESCOTT und BREED überein, daß die Zellen nach dem Zentrifugieren in unterschiedlichem Maße auf Sediment, Magermilchanteil und Rahmschicht verteilt sind. Sie empfehlen ein chemisches Verfahren zur Emulgierung des Fettes. Bei dieser Präparationsmethode, als Emulgator wurde Witopal CO hochkonzentriert (Äthylphenolpolyglykoläther) verwendet, erhielten die Autoren im Vergleich zur mikroskopischen Auszählung nach PRESCOTT und BREED einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,98$ und eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. DIJKMAN, SCHIPPER und WALSTRA (1966) verglichen diese Methode der chemischen Aufbereitung mit der Methode nach PHIPPS und NEWBOULD und kamen übereinstimmend zu dem Ergebnis, daß dem Verfahren nach TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN der Vorzug zu geben sei. TERPLAN und SCHLEYERBACH (1967) bestätigten, daß die von TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN empfohlene Aufbereitung der Milchproben in ein nahezu praxisreifes Stadium getreten sei. Versuche von TERPLAN und SCHLEYERBACH zur Fixierungsdauer mit Formalin im Vakuum zeigten sich dem ebenfalls verwendeten Glutaraldehyd unterlegen. Mit Glutaraldehyd wurden die Zellen zwar bereits binnen 2 Stunden ausreichend fixiert, jedoch erlaubte diese Methode die Aufbewahrung der Proben nur bis maximal 4 Stunden. Mit einem Gemisch aus Formalin und Glutaraldehyd wurden auch nach längerer Aufbewahrung noch gute Ergebnisse erzielt.

KLEINSCHROTH, RICHTER und SCHUMANN (1968) überprüften an über 100.000 Zellzahlbestimmungen, bei denen bereits einige der 1968 von ZEIDLER, TOLLE und HEESCHEN vorgeschlagenen Verbesserungen berücksichtigt wurden, die Genauigkeit des EPZ im Vergleich zum MZ nach PRESCOTT und BREED und errechneten einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,97$. Sowohl CULLEN (1965), DIJKMAN, SCHIPPER und WALSTRA (1966) als auch KLEINSCHROTH, RICHTER und SCHUMANN (1968) weisen auf vereinzelt auftretende erhöhte Zellwerte nach chemischer Aufbereitung hin, die auf eine ungenügende fettlösende Wirkung des Emulgators, sowie auf die von KLEINSCHROTH, RICHTER und SCHUMANN beobachtete Benetzung des oberen Randes der Reagenzgläser mit Milchtropfen beim Pipettieren zurückzu-

führen sind. KLEINSCHROTH und Mitarbeiter empfehlen daher die Verwendung einer Randabdeckplatte beim Pipettieren.

TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN haben 1968 folgende Methode der Probenaufbereitung zum EPZ empfohlen:

- a) Stabilisierung, Konservierung und Kenntlichmachung von 10 ml der Milchprobe mit 0,2 ml der Lösung:

10 ml Formaldehyd sol. 35 %

0,02 g Eosin wasserlöslich

Aqua. dest. ad 100 ml

Nach 24 stündiger Fixierung bei Zimmertemperatur können die Proben maximal 72 Stunden bei Kühlschranktemperatur bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt bleiben. Eine Schnellfixation (30 Min. bei 60 °C) ist nur bei frischen und geringgradig verkeimten Proben möglich.

- b) Fettemulgierung und Verdünnung auf ein Volumenverhältnis von 1 : 100 mit einer Lösung aus:

84,0 Vol % physiol. NaCl

12,5 Vol % Äthanol 96 %

1,0 Vol % Formaldehyd sol.

pH 7,0

2,0 Vol % Triton-X-100

Nach Inkubierung für 10. Min. bei 80 °C müssen die Proben auf Zimmertemperatur abgekühlt und binnen 3 Stunden elektronisch ausgezählt werden.

Nach ZEIDLER, TOLLE und HEESCHEN (1968) kann mit dieser Methode bei Vergleichen mit der mikroskopischen Auszählung nach PRESCOTT und BREED ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,97$ erreicht werden. Auch GUTHY et. al. (1970) ermittelten, daß bei korrektem Arbeiten der Milchzellgehalt elektronisch mit einer Genauigkeit bestimmt werden kann, die den bisherigen Methoden zumindest entspricht. BRUNOLD (1972) erreichte bei solchen Vergleichsuntersuchungen die von anderen Autoren angegebenen Korrelationswerte nicht und spricht von signifikanten Unterschieden der Ergebnisse.

HAUKE (1969) beschreibt elektronische Zellgehaltsbestimmungen in Milch mit dem elektronischen Teilchenzählgerät TuR ZG 1 vom Transformatoren- und Röntgenwerk Dresden. Das Gerät arbeitet wie der Coulter Counter nach der Leitfähigkeitsmethode. Die untersuchten Proben wurden nach TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN (1966) aufbereitet. Neben Witopal CO und Triton-

X-100 wurde der Dispergator BO (Alkylphenolpolyglykoläther) als Emulgator verwendet. Bei Untersuchung dieser 3 Substanzen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. HAUKE beurteilt das EPZ als wesentlich genauer und weniger arbeitsaufwendig als die bisher übliche mikroskopische Bestimmungsmethode nach PRESCOTT und BREED. JOHST (1971) verwendet bei seinen Versuchen mit dem elektronischen Partikelzählgerät den Emulgator Präwozell W - ON (VEB Bunawerke Schkopau) und beurteilt diesen dem Triton-X-100 als gleichwertig.

2.2.3. Optische Partikelzählung (OPZ) im Durchflußverfahren

Ein in der Humanmedizin für den Bereich der Hämatologie routinemäßig eingesetztes Verfahren der optischen Zählung in der kontinuierlichen Durchflußanalyse wird auch angewandt zur Erfassung des Milchzellgehaltes. Als Vorteile dieses Verfahrens werden geringer Arbeitsaufwand bei hoher Probenfrequenz in der Zeiteinheit und gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse genannt (TECHNICON 1967 und 1971 b).

Das Auto-Analyzer Grundsystem zur Partikelzählung in Milch besteht nach TECHNICON (1971) aus:

- a) Probennehmer mit Probenteller
- b) Proportionierpumpe
- c) Heizbad
- d) "Cell Counter"
- e) Schreiber ("Recorder")

Die Bausteine dieses Systems sind durch Schläuche miteinander verbunden. Bestimmte Schlauchlumina sichern die Entnahme definierter Mengen von Proben und Reagenzien, die durch die Proportionierpumpe angesaugt und vermischt werden. Diese Proben-Reagenziengemische werden im kontinuierlich fließenden System durch Luftblasen abgegrenzt und zur Fetteulgierung unter konstanten Zeit- und Temperaturbedingungen durch ein Heizbad geleitet. Damit sind für jede Probe konstante Analysenbedingungen gegeben. Die Erfassung der somatischen Zellen, im festgelegten Größenbereich (Schwellenwert), erfolgt nach einem optischen Prinzip (Dunkelfeld) beim Durchfluß durch eine Kuvette im "Cell Counter". Dabei entstehende Impulse werden elektronisch verstärkt und als analoge Daten im "Recorder" aufgezeichnet.

Nach HEESCHEN, TOLLE, REICHMUTH und ZEIDLER (1972) ist durch mitlaufende Partikel-Standard-Suspensionen eine ständige Überprüfung des Systems und eventuell eine Nachkalibrierung möglich und dadurch die Reproduzierbarkeit und Korrelation der Probenergebnisse gewährleistet.

Die zur Zählung somatischer Zellen nötige Aufbereitung der Milchproben und Reagenzien wird von TECHNICON (1971 a) wie folgt beschrieben: Stabilisierung und Konservierung von 5 ml Probe mit 0,1 ml partikelfrei filtrierter Lösung von:

40 ml Formaldehyd sol. 37 %

Aqua dest. ad 100 ml

Nach gründlichem Durchmischen werden die Proben 24 Std. bei Zimmertemperatur fixiert, wonach eine Aufbewahrung bis zu 48 Std. bei Kühlschranktemperatur möglich ist. Schnellfixation ist möglich bei sehr frischen und nur geringgradig verkeimten Proben.

Die Herstellung des "Clarification Reagent" erfolgt nach TECHNICON:

- a) 900 ml Methanol abs. im Eisbad abkühlen. 350 g KOH langsam hinzufügen. "Verdünnen auf 1.000 ml Methanol". Bei Zimmertemperatur 2 - 3 Tage zum Absetzen der unlöslichen Karbonate stehen lassen. Überstand abgießen und zur weiteren Aufbereitung verwenden.
- b) 120 g Hydroxylaminhydrochlorid in 900 ml Methanol abs. lösen (endotherm - Heizplatte benutzen), auf 1.000 ml Methanol verdünnen.
- c) 500 ml Triton-X-100 mit 500 ml Methanol abs. vermischen.
- d) 200 g EDTA in 900 ml Aqua dest. lösen, auf 1.000 ml Aqua dest. auffüllen.

Sechs Teile dieses Reagenz sind mit 4 Teilen Aqua dest. zu vermischen und partikelfrei zu filtrieren.

Verdünnungsreagenz:

Glutaraldehyd 25 %ig	10 g
(od. Glutaraldehyd 50 %ig 5,0 g)	
Methanolische Triton-X-100 Lösung	
50 %ig	2 ml
Aqua dest.	ad 1.000 ml

Nach persönlicher Mitteilung von TECHNICON kann als "Clarification Reagent" auch Fertigreagenz verwendet werden. 3 Teile von "Part A" sind mit einem Teil "Part B" zu vermischen. 6 Teilen dieser Mischung sind 4 Teile Aqua dest. zuzufügen und dann partikelfrei zu filtrieren. Als Ver-

dünnungsreagenz soll dann auch das entsprechende TECHNICON Fertigreagenz verwendet werden.

HEESCHEN, TOLLE, REICHMUTH und ZEIDLER (1971) geben folgende Aufbereitungsanleitungen:

Stabilisierung, Konservierung und Kenntlichmachung von 10 ml Probe mit 0,2 ml partikelfrei filtrierter Lösung von:

10 ml Formaldehyd sol. 35 %
 0,02 g Eosin wasserlöslich
 Aqua dest. ad 100 ml

"Clarification Reagent":

Kaliumhydroxyd 35 %ig in Methanol abs.	1.000 ml
Hydroxylaminhydrochlorid 12,0 %ig in	
Methanol abs.	1.000 ml
Methanolische Triton-X-100 Lösung	
55 %ig in Meth. abs.	1.000 ml
EDTA 22,2 %ig in Aqua dest.	1.000 ml

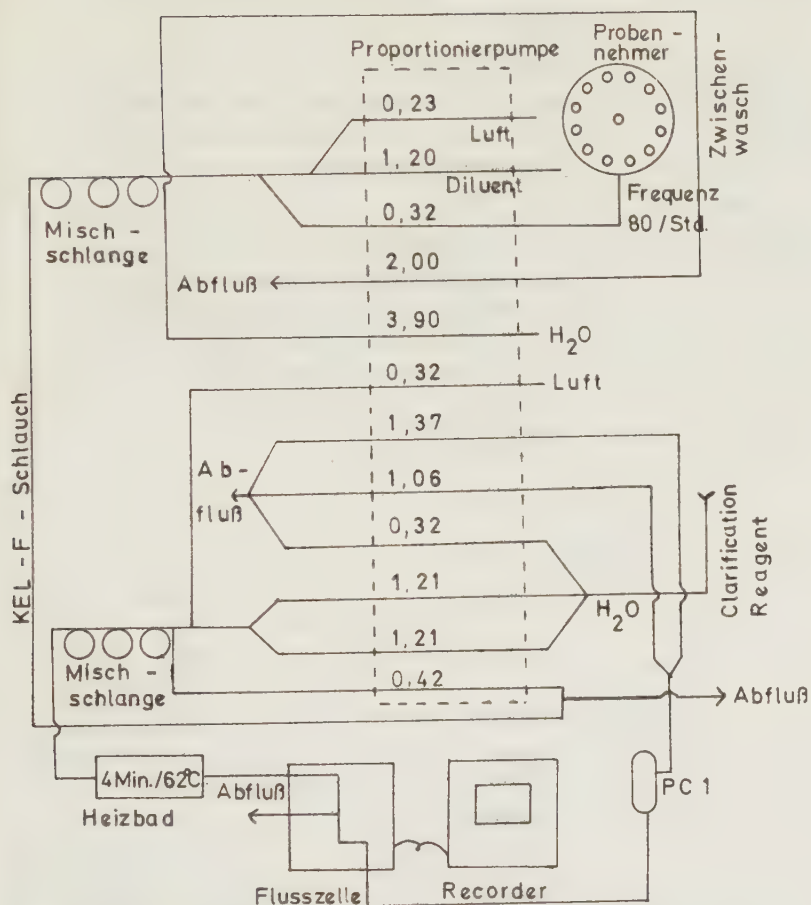
Für die gebrauchsfertige Lösung werden 6 Teile des "Clarification Reagent" mit 4 Teilen Aqua dest. verdünnt und partikelfrei filtriert.

Verdünnungsreagenz:

Glutaraldehyd 25 %ig	10 g
Methanolische Triton-X-100 Lösung	
50 %ig	1 ml
Aqua dest.	ad. 1.000 ml

Bei diesen Analysenmethoden (TECHNICON 1971 a, persönliche Mitteilung 1972 und HEESCHEN et. al. 1972) werden (Flußdiagramm Abb. 2) 0,32 ml der fixierten Milchprobe mit 1,20 ml Verdünnungsflüssigkeit verdünnt und mit 0,23 ml Luft segmentiert. Von dieser Mischung werden 0,42 ml entnommen und mit etwa 1,1 ml des "Clarification Reagent" versetzt. Bei diesem Flußschema erfolgt die Erhitzung im Heizbad für die Dauer von 4 Min. bei 62° C.

Abbildung 2



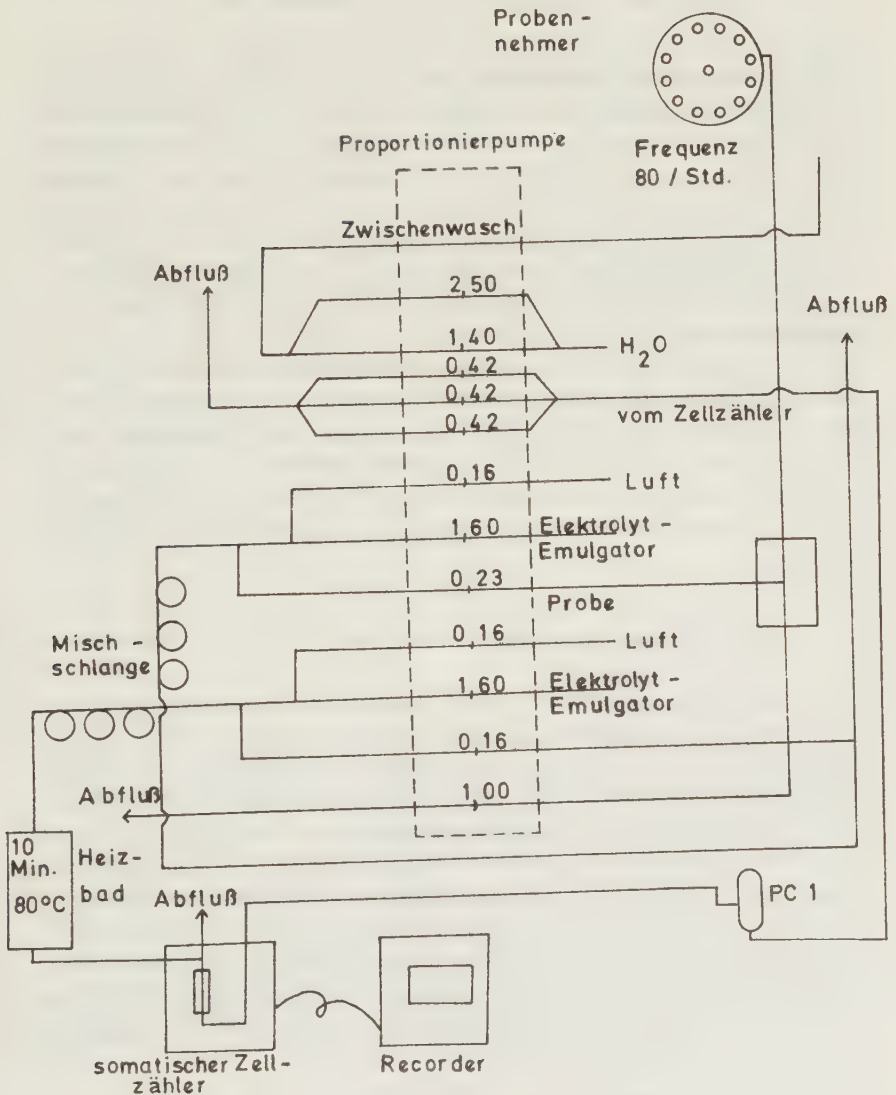
Zählung somatischer Zellen in Milch mit dem Auto - Analyzer System II (Clarification Reagent)

HEESCHEN et al. (1971) ermittelten mit der von ihnen beschriebenen Methode aus unabhängigen Doppelansätzen einen Korrelationswert zwischen EPZ und OPZ im Auto-Analyzer I von $r = 0,92$.

Nach HEESCHEN et al. (1971) und HEESCHEN, TOLLE, REICHMUTH und ZEIDLER (1972) ist durch geringfügige Änderungen am Flußschema die Verwendung des für das EPZ gebräuchlichen Elektrolyt-Emulgator-Gemisches anstelle des "Clarification Reagent" und der Verdünnungsflüssigkeit möglich.

Hierbei werden 0,23 ml der fixierten Probe mit 1,60 ml Elektrolyt-Emulgator verdünnt und mit 0,16 ml Luft segmentiert. Nach gründlichem Durchmischen werden hiervon 0,16 ml wiederum mit 1,60 ml Elektrolyt-Emulgator verdünnt und mit 0,16 ml Luft segmentiert. Die Endverdünnung beträgt somit 1 : 88. Die Emulgierung des Fettes erfolgt nach nochmaliger Durchmischung im Heizbad bei 80° C für die Dauer von 10 Minuten.

Abbildung 3



Zählung somatischer Zellen in Milch mit dem Auto - Analyzer System II (Elektrolyt - Emulgator)

Die für diese Modifikation erforderlichen Stabilisierungs- bzw. Konservierungsflüssigkeit, sowie die Elektrolyt-Emulgator-Lösung sind unter 2.2.2. (TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN 1968) beschrieben.

Diese Methode wurde von mehreren Untersuchern überprüft. SCHULZE (1971) errechnete zwischen dem MZ und der OPZ mittels Auto-Analyzer II aus Sammelmilchproben eine Korrelation von $r = 0,96$. Die Ergebnisse des Auto-Analyzer II lagen bei diesen Untersuchungen ca. 20 % über denen der direkten mikroskopischen Zählung. Die Standardabweichung des optischen Zählverfahrens ist nach diesem Untersucher wesentlich geringer als bei dem MZ. HEESCHEN et al. (1972) ermittelten eine Korrelation von $r = 0,92$ zwischen der EPZ und dem Auto-Analyzer II. Die Korrelation zwischen unabhängigen Ansätzen im Auto-Analyzer II betrug $r = 0,98$. Zwischen mikroskopischer und optischer Partikelzählung wird ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,97$ angegeben. STAHLHUTH - KLIPP (1973) bestimmte den Zellgehalt von 599 Viertelgemelksproben parallel elektronisch und optisch in der automatischen Durchflußanalyse und errechnete eine Korrelation von $r = 0,94$. TOLLE (1971) hebt besonders hervor, daß bei der Zählung somatischer Zellen im Auto-Analyzer-System Fehler entfallen, die bei manueller Präparationstechnik auftreten (insbesondere Pipettier- und Verdünnungsfehler).

2.3. Indirekte Methoden zur Bestimmung des Milchzellgehaltes

Der Whiteside-Test (WHITESIDE 1939), modifiziert von MURPHY und HANSON (1941), findet in der Schweiz als sogenannter "Laugentest" als Qualitätskriterium für Anlieferungsmilch Anwendung. Die bei positiver Reaktion eintretende Viskositätsänderung, bedingt durch die Bildung eines Nukleinsäure - Natriumsalzes soll mit dem Leukozytengehalt der Milch korrelieren. Als Reaktionsgrenze werden von OBIGER (1957) 250.000 Zellen/ml Milch angegeben. KOWALCZYK (1962) und TEMPLE (1963) hingegen fanden positive Reaktionen erst bei Zellgehalten von mehr als 500.000 Zellen/ml Milch und TERPLAN und SCHLEYERBACH (1967) stellten fest, daß 44 % der Milchproben mit Zellgehalten von 500.000 bis 1 Mill. keine positive Reaktion zeigen. Erst bei Werten von mehr als 1 Mill. Zellen/ml Milch fanden sie bei ca. 90 % der Proben positive Reaktion.

Ähnlich dem Whiteside-Test wird der von SCHALM (1960) beschriebene California-Mastitis - oder Schalm-Test anhand Viskositätsänderungen in Milchproben mit erhöhtem Zellgehalt beurteilt. LEIDL et al. (1962) untersuchten

6.011 Viertelgemelksproben und stellten fest, daß nur 0,2 % von 3.223 SMT - negativen Proben mehr als 500.000 Zellen/ml Milch nach PRESCOTT und BREED enthielten.

Die Brabanter-Mastitis-Reaktion wurde von JAARTSVELD (1962) aus dem Schalm-Test entwickelt. HEESCHEN (1966) stellte gute Korrelationen zwischen der BMR und mittels mikroskopischer Auszählung ermittelter Zellzahlen fest. TERPLAN und SCHLEYERBACH (1967) fanden positive Brabanter-Mastitis-Reaktion ab etwa 300.000 Zellen/ml Milch.

Der von THOMPSON und POSTLE (1964) veröffentlichte Wiscon-Mastitis-Test gleicht der BMR, während die Aulendorfer Mastitisprobe aus dem Schalm-Test abgeleitet ist und in Baden-Württemberg angewendet wird.

Nach ASTERMARK (1971) stimmen mikroskopisch ermittelte Zellgehalte nicht immer mit den Ergebnissen der indirekten Tests überein. Die besten Übereinstimmungen werden nach diesem Autor mit dem California-Mastitis-Test erreicht.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Entnahme der Proben

Die Viertelgemelksproben (ca. 50 ml) wurden im Rahmen des normalen Melkens nach Vorreinigen und Anrücken des Euters, sowie Verwerfen der ersten Strahlen (Kontrolle des Vorgemelkes) nach DIERNHOFER (1950) entnommen. Sie stammten aus mehreren Betrieben im Raume München.

3.2. Untersuchungsmethodik

3.2.1. Mikroskopisches Zählverfahren (MZ) nach PRESCOTT und BREED

Während der Morgenmelkzeit entnommene Proben wurden am selben Tage, während der Abendmelkzeit entnommene am nächsten Morgen (nach Aufbewahrung im Kühlschrank bei 2° bis 4° C) für das direkte MZ nach PRESCOTT und BREED (in der Modifikation von LEIDL, SCHALM und LÜPS, 1961) auf gereinigte und entfettete Objektträger ausgestrichen und gefärbt.

Die Auswertung erfolgte nach LEIDL, SCHALM und LÜPS (1961). Der von der Optik des Mikroskopes (Gesichtsfeld) abhängige Faktor betrug 39.299. Zur Vereinfachung des Berechnungsganges beim großen Probenumfang wurde dieser Faktor auf 40.000 aufgerundet. Eine Erfassung des Zellgehaltes mit diesem korrigierten Faktor beinhaltet eine Ergebnisabweichung von ca. 1,7 %, die bei der Variabilität des Gehaltes somatischer Zellen in Milch bei der statistischen Vergleichsberechnung vernachlässigt werden kann.

Als zelluläre Elemente wurden nach SCHALM, CARROLL und JAIN (1971) beurteilt:

- a) Somatische Zellen mit Kern innerhalb des Gesichtsfeldes; randständige Zellen wurden mitgezählt, wenn sie zu mehr als 50 % ihres Volumens im Blickfeld lagen.
- b) Freie Kerne mit mehr als 50 % der durchschnittlichen Kernmasse.
- c) Zytoplasmatische Massen ohne Kern, sowie Zellfragmente mit wenig Kernmaterial wurden nicht berücksichtigt.

3.2.2. Elektronisches Partikelzählverfahren (EPZ)

Stabilisierung und Aufbereitung der Milchproben für die elektronische Zählung erfolgte nach dem von ZEIDLER, TOLLE und HEESCHEN (1968) beschriebenen Verfahren. Die Stabilisierungsflüssigkeit wurde vorrätig gehalten, das Elektrolyt-Emulgator-Gemisch 2 - 3 Tage vor jeder Zählung frisch angesetzt. Beide Reagenzien wurden über einen Membranfilter (mittlere Porenweite 0,2 μ) partikelfrei filtriert, wonach der Leerwert unter 2.000 Zellen/ml lag.

10 ml der Milchprobe wurden etwa 1 - 4 Stunden nach der Probenentnahme mit 0,2 ml 3,5 %iger Formaldehydlösung versetzt, zur gleichmäßigen Verteilung des Formalins mehrmals geschwenkt und 30 Min. bei 60° C bzw. 24 Std. bei Zimmertemperatur fixiert. Anschließend wurden mittels Pipettierautomat 0,1 ml der Milchprobe mit 9,9 ml Elektrolyt-Emulgator-Gemisch verdünnt und für 10 Min. bei 80° C im Wasserbad inkubiert. (Zur Prüfung des Pipettierautomaten wird unter 3.4. berichtet). Nach Abkühlung der Proben auf Zimmertemperatur wurden sie umgehend elektronisch (Coulter Counter "Modell F", Meßstrecke 0,1 ml, Verdünnungsfaktor 1 : 100) gezählt.

Vor und während der Viertelgemelksprobenuntersuchungen wurden wiederholt Festlegungen des optimalen Schwellenwertes vorgenommen. Verwendet wurden dazu frische Milchproben mit Zellgehalten zwischen einer und zwei Millionen Zellen pro ml. Zehn Ansätze einer derartigen Probe wurden präpariert, in einem 100 ml-Becherglas gepoolt und bei Kontrolle von Impulsbild und Kapillaröffnung mit ständiger Erhöhung des Schwellenwertes gemessen und die Ergebnisse als Summenkurve aufgezeichnet. Nach ZEIDLER, TOLLE und HEESCHEN (1968) und TOLLE (1971) liegt der optimale Schwellenwert für frische Viertelgemelksproben, bei dem selektiv nur die somatischen Zellen in Milch erfaßt werden, kurz vor dem deutlichen Abfall der Kurve am Ende des Zählplateaus.

Zur Eichung des Gerätes wurden vor jeder Messung und zur eventuellen Nachkalibrierung während der Partikelzählung, freundlicherweise vom Institut für Milchhygiene der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel zur Verfügung gestellte Leukozyten-Standard-Suspensionen verwendet.

3.2.3. Optische Partikelzählung im Durchflußverfahren

Für die optische Partikelzählung im Durchflußverfahren (Auto-Analyzer II) wurden sämtliche Proben ebenfalls 1 - 4 Stunden nach der Entnahme stabilisiert. Die jeweilige Stabilisierungsflüssigkeit wurde vorrätig gehalten, während die Verdünnungsflüssigkeit, das "Clarification Reagent" bzw. der Elektrolyt-Emulgator jeweils 2 - 3 Tage vor der Zählung frisch angesetzt und partikelfrei filtriert wurden (Leerwert unter 2.000 Zellen/ml). Der Elektrolyt-Emulgator wurde mit m-Trispufferlösung auf pH 7,0 eingestellt.

Schwellenwertbestimmungen und Eichungen des Gerätes wurden wie beim EPZ (3.2.2.) beschrieben durchgeführt. Zur Kontrolle des Systems (eventuelle Nacheichung) wurde nach jeweils 10 Proben ein Partikelstandard eingefügt. Die Probenfrequenz betrug bei allen Messungen 80/Std.

3.3. Versuche zur Ermittlung geeigneter Reagenzien zur optischen Partikelzählung im Durchflußverfahren

Während das MZ nach PRESCOTT und BREED und das EPZ mittels Coulter Counter bei allen Proben konstant nach den Anweisungen von LEIDL, SCHALM und LÜPS (1961) bzw. ZEIDLER, TOLLE und HEESCHEN (1968) erfolgte, mußten für die OPZ im Durchflußverfahren mittels Auto-Analyzer II Versuche zur Ermittlung geeigneter Reagenzien vorgenommen werden, zumal das zur Verfügung stehende Gerät firmenseitig für das Flußschema mit Verwendung des "Clarification Reagent" eingerichtet war (Abb. 2).

Bei zunächst 195 Proben wurden jeweils das "Clarification Reagent" und die Verdünnungslösung nach TECHNICON (1971 a), bzw. das "Clarification Reagent" und die Verdünnungslösung nach HEESCHEN, TOLLE, REICHMUTH und ZEIDLER (1971), bei weiteren 98 Proben die TECHNICON Fertigreagenzien nach persönlicher Mitteilung verwendet. (Flußschema Abb. 2). Nach Umstellung des Flußschemas auf die in Abb. 3 angegebene Anordnung kamen weitere 100 Proben mit dem Elektrolyt-Emulgator-Gemisch nach HEESCHEN, TOLLE, REICHMUTH und ZEIDLER (1971, 1972) zur Messung.

Der Vergleich zwischen den drei Methoden zur Bestimmung des Zellgehaltes (mikroskopische, elektronische und optische), als auch der zwischen den unterschiedlichen Methoden in der automatischen Durchflußanalyse erfolgte über die Ermittlung der Korrelationskoeffizienten. Der Berechnung des Korrelationskoeffizienten wurden die logarithmisch transformierten Mittelwerte von Doppelmessungen zugrunde gelegt. Für die einzelnen Versuchsgruppen ergaben sich zwischen den Zellzählungsmethoden bei unterschiedlicher Fixation und Verwendung verschiedener Reagenzien aus jeweils 195 Viertelgemelksproben folgende Korrelationskoeffizienten (r).

Tabelle 1: Korrelationen der verschiedenen Zellzählverfahren bei Verwendung unterschiedlicher Reagenzien für die OPZ unter Berücksichtigung der Fixationsdauer (n = 195)

Zellzähl- verfahren	Korrelationskoeffizient (r) bei Fixation	
	24 Std. Zimmertemp.	30 Min. 60° C
MZ : EPZ	0,94	0,88
MZ : OPZ (Reag.n. Hee- schen et al.1971)	0,93	0,89
MZ : OPZ(Reag. n. Technicon 1971 a)	0,91	0,89
EPZ : OPZ(Reag. n. Heeschen et al. 1971)	0,89	0,90
EPZ : OPZ(Reag. n. Technicon 1971 a)	0,89	0,89

Bei weiteren 98 Viertelgemelksproben ergaben sich bei der Verwendung der TECHNICON Fertigreagenzien die in Tabelle 2 aufgeführten Korrelationswerte.

Tabelle 2: Korrelationen der verschiedenen Zellzählverfahren bei Verwendung der TECHNICON Fertigreagenzien für die OPZ unter Berücksichtigung der Fixationsdauer (n = 98).

Zellzähl- verfahren	Korrelationskoeffizient (r) bei Fixation	
	24 Std. Zimmertemp.	30 Min. 60° C
MZ : EPZ	0,93	0,87
MZ : OPZ	0,54	0,87
EPZ : OPZ	0,55	0,75

Nach Umstellung des Fluß- und Proportionierschemas des Auto-Analyzer II auf Verwendung des auch für das EPZ üblichen Elektrolyt-Emulgator-Gemisches (ZEIDLER, TOLLE und HEESCHEN 1968) und Untersuchung weiterer 100 Viertelgemelksproben, 24 Std. bei Zimmertemperatur fixiert, konnten die in Tabelle 3 aufgeführten Korrelationen ermittelt werden.

Tabelle 3: Korrelationen der verschiedenen Zellzählverfahren
bei Verwendung des Elektrolyt-Emulgator-Gemisches
für die OPZ (n = 100)

Zellzähl- verfahren	Korrelationskoeffizient (r)
	24 Std. bei Zimmertemp. fixiert
MZ : EPZ	0,92
MZ : OPZ	0,93
EPZ : OPZ	0,90

Nach den in den Tabellen 1, 2 und 3 aufgeführten Korrelationskoeffizienten, die sich aus der Verwendung verschiedener Reagenzien und Fixierungsarten und zwischen den Methoden zur Zählung somatischer Zellen in Milch ergaben, wurden für weitere Untersuchungen die Proben 24 Std. bei Zimmertemperatur fixiert und der Elektrolyt-Emulgator sowohl für das EPZ als auch für die OPZ verwendet.

3.4. Ermittlung des Aufbereitungs- und Gerätefehlers

Zur Überprüfung, ob die Fixierung der Zellen bei Abweichungen vom empfohlenen Volumen von 10,0 ml (viele Autoren geben "ca. 10 ml" an) einen Einfluß auf die Ergebnisse der Zählung hat und inwieweit bei konstanter Milchmenge die Variabilität durch Einsatz eines Pipettierautomaten bzw. einer Mikroliter-Pipette (Marburg) eingeschränkt werden kann, wurde für das EPZ folgende Versuchsanordnung gewählt:

- a) Pipettieren von exakt 8 ml, 10 ml und 12 ml Probe in jeweils 6 Reagenzgläser (Fixation: 24 Std. /Zimmertemperatur).
- b) Poolen* dieser jeweils parallelen Ansätze in drei 100 ml Bechergläsern.
- c) Entnahme von 6 mal 0,1 ml fixierter Milchprobe aus jedem Pool und Verdünnung mit 9,9 ml Elektrolyt-Emulgator mittels Pipettierautomat in Reagenzgläsern.
- d) Entnahme von 6 mal 0,1 ml fixierter Milchprobe aus jedem Pool mittels Mikroliter-Pipette (Marburg) und Verdünnung mit 9,9 ml Elektrolyt-Emulgator mittels geeichter Pipetten.
- e) Inkubierung der Verdünnungsansätze c) und d) für 10 Min. bei 80° C im Wasserbad.
- f) Doppelmessung jeder der nach c) bis e) aufbereiteten Proben nach Umfüllen in Meßgläschen.

Für die mittels Pipettierautomaten aufbereiteten Proben wurden die Meßdaten mit Hilfe der hierarchischen Varianzanalyse ausgewertet (Tabellen 4 und 5).

Tabelle 4: Tafel der Varianzanalyse; EPZ, Pipettierautomat

Varianzursache	SQ	FG	MQ
zwischen Milchmenge (A)	10.216,5	2	5.108,3
innerhalb der gepoolten Probe zwischen den Meßgläschen (B)	2.785,75	15	185,7
innerhalb der Meß- gläschen (I)	3.184,5	18	176,9
Total	16.168,75	35	

Zeichenerklärung:

SQ = Summe der Abweichungsquadrate

FG = Freiheitsgrade

MQ = mittlere Abweichungsquadrate

$$MQI = S_e^2 = 176,9 \longrightarrow S_e = 13,3$$

$$MQB = S_e^2 + 2S_b^2 \longrightarrow S_b = 2,1$$

Die Varianz zwischen den Meßgläschen ist bei der gewählten Versuchsanordnung kleiner als die innerhalb der Meßgläschen. Aus diesem Grunde wurden zur Bestimmung eines eventuellen signifikanten Unterschiedes aus dem Einfluß unterschiedlicher Milchmengen, im Endeffekt unterschiedlicher Formalkonzentrationen, auf die Zählung, die beiden zuletzt genannten Varianzen in Tabelle 5 zusammengefaßt. Dieses Vorgehen wurde auch zur Verschärfung des Testes gewählt.

Tabelle 5: Tafel der Varianzanalyse; EPZ, Pipettierautomat
(Zusammenfassung der Einzelmessungen innerhalb
der Milchmengen)

Varianzursache	SQ	FG	MQ
zwischen Milch- menge	10.216,5	2	5.108,3
innerhalb Milch- menge	5.970,25	33	180,9
Total	16.186,75	35	

$$F = \frac{5.108,3}{180,9} = 28,2 \quad F(0,99; 2, 33) = 5,29$$

Aus Tabelle 5 ist zu erkennen, daß durch die Verwendung verschiedener Milchvolumina zur Fixierung sich ein Unterschied mit mehr als 99 %iger Sicherheit ergibt.

Legt man den Mittelwert der Meßergebnisse bei 10 ml Milchproben als 100 % zugrunde, so beträgt der entsprechende Wert für 8 ml 107,6 % für 12 ml 86,6 %.

Tabelle 6: Tafel der Varianzanalyse; EPZ, Mikroliter-Pipetten

Varianzanalyse	SQ	FG	MQ
zwischen Milch- menge (A)	9.145,5	2	4.572,8
innerhalb der gepool- ten Probe zwischen den Meßgläschen (B)	4.371,5	15	291,4
innerhalb Meßgläschen (I)	936,0	18	52,0
Total	14.453,0	35	

$$MQI = S_e^2 = 52 \longrightarrow S_e = 7,2$$

$$MQB = S_e^2 + 2S_b^2 \longrightarrow S_b = 11,0$$

Tabelle 7: Tafel der Varianzanalyse; EPZ, Mikroliter-Pipette
(Zusammenfassung der Einzelmessungen innerhalb
der Milchmengen)

Varianzursache	SQ	FG	MQ
zwischen Milch- menge	9.145,5	2	4.572,8
innerhalb Milch- menge	5.307,5	33	160,8
Total	14.453,0	35	

$$F = \frac{4.572,8}{160,8} = 28,4 \quad F(0,99; 2, 33) = 5,29$$

Auch hier ist zu erkennen, daß sich ein Unterschied aus der Verwendung verschiedener Milchvolumina zur Fixierung mit mehr als 99 %iger Sicherheit ergibt. Legt man den Mittelwert der Meßergebnisse bei 10 ml Milchproben wieder als 100 % zugrunde, so beträgt der entsprechende Wert für 8 ml 104,7 % und für 12 ml 86,0 %.

Die Varianz der Doppelbestimmung der mittels Mikroliter-Pipetten (Marburg) aufbereiteten Proben ist kleiner als die der mittels Pipettierautomat aufbereiteten. Beide liegen jedoch unter der nach der POISSON - Verteilung zu erwartenden Varianz, so daß diese Werte unberücksichtigt bleiben können. (Die sehr kleine Streuung des Pipettierautomaten von $S_b = 2,1$ darf wohl als Zufallsergebnis gewertet werden.) Die Abweichung der Ergebnismittelwerte der verschiedenen aufbereiteten Proben liegt bei 2,5 %.

Da auch für die optische Partikelzählung die Volumenangabe der zu fixierenden Milchproben in der Literatur häufig mit "ca. 10 ml" angegeben ist, wurden wiederum Vergleichsmessungen mit 8,0 ml, 10,0 ml und 12,0 ml Milchprobe als Vorlage für Konservierung und Stabilisierung durchgeführt. Analog zu den Ermittlungen im elektronischen Zellzählungssystem wurden diese Proben gepoolt und für die parallelen Doppelbestimmungen im opti-

schen System aus dem Pool wieder auf die ursprüngliche Probenfrequenz aufgeteilt.

Die einzelnen Meßdaten wurden analog der vorherigen Methode varianzanalytisch ausgewertet (Tabellen 8 und 9).

Tabelle 8: Tafel der Varianzanalyse; OPZ

Varianzursache	SQ	FG	MQ
zwischen Milchmenge (A)	34,200	2	17.100
innerhalb der gepoolten Probe zwischen den Meßgläsern (B)	4,700	15	313,3
innerhalb der Meßgläsern (I)	3,400	18	188,9
Total	42,300	35	

$$MQI = S_e^2 = 188,9 \longrightarrow S_e = 13,74$$

$$MQB = S_e^2 + 2S_b^2 \longrightarrow S_b^2 = 62,2 \longrightarrow S_b = 7,89$$

Tabelle 9: Tafel der Varianzanalyse; OPZ
(Zusammenfassung der Einzelmessungen
innerhalb der Milchmengen)

Varianzursache	SQ	FG	MQ
zwischen Milch- menge	34.200	2	17.100
innerhalb Milch- menge	8.100	33	245,5
Total	42.300	35	

$$F = \frac{17.100}{245,5} = 69,6 \quad , \quad F(0,99; 2, 33) = 5,29$$

Es ist auch hier ersichtlich, daß bei unexaktem Arbeiten beim Bemessen der für die Fixation verwendeten Milchmengen Ergebnisfehler auftreten können.

Errechnet man aus der Varianz der Doppelbestimmung (Tab. 8) von $S_e^2 = 188,9$ die Streuung mit $S_e = 13,74$, so zeigt sich, daß letztere einen Wert zwischen 1 und 2 Einheiten der Ablesegenauigkeit des Gerätes, also zwischen 10.000 bis 20.000 Zellen/ml, entspricht.

Die sechs Varianzen der jeweils zwölf Messungen innerhalb der zu fixierenden Milchmenge und der Verdünnungsmethoden beim EPZ wurden mit Hilfe der "F" - Verteilung miteinander verglichen. Von den 30 möglichen Quotienten zweier Varianzen weisen drei auf einen hochsignifikanten Unterschied der Varianzen hin. Verursacht wurde das durch die Messungen der 12 ml Milchmenge, aufbereitet mittels Mikroliter-Pipette (Marburg). Die Varianz war hier wesentlich kleiner als bei 8 ml Milchmenge, sowohl bei Aufbereitung mittels Mikroliter-Pipette als auch bei Verwendung des Pipetierautomaten und bei 10 ml Milchmenge, aufbereitet mittels Mikroliter-Pipette. Aus diesem Ergebnis wurden keine Schlüsse hinsichtlich einer Be-

einflussung der Streuung in Bezug auf die zu fixierende Milchmenge gezogen. Bei der OPZ deutete keiner der sechs möglichen Quotienten der Varianzen auf einen hochsignifikanten Unterschied der letzteren hin.

3.5. Korrelationen zwischen den gebräuchlichsten Zellzählverfahren (MZ, EPZ, OPZ)

Zur Prüfung der Möglichkeit des Einsatzes der OPZ in der Praxis wurde von 650 Milchproben der Zellgehalt mittels MZ, EPZ und OPZ bestimmt und die Ergebnisse durch Berechnung der Korrelationskoeffizienten aus logarithmisch transformierten Mittelwerten von Doppelbestimmungen der Proben zueinander in Beziehung gesetzt. Es ergaben sich folgende in Tabelle 10 dargestellte Korrelationen.

Tabelle 10: Korrelationen zwischen den Zählverfahren
(n = 650)

Zählverfahren	Korrelationskoeffizient (r)
MZ : EPZ	0,90
MZ : OPZ	0,90
EPZ : OPZ	0,91

4. DISKUSSION

Der Gehalt somatischer Zellen in Milch wird allgemein als empfindliches und quantifizierbares Kriterium für den Gesundheits- und Funktionszustand der bovinen Milchdrüse angesehen (HESS, 1969; BAUMGARTNER und HUBER, 1971; TOLLE, 1971 u. a.). Nach TOLLE (1969) und STAHLHUTH - KLIPP (1973) besteht zudem bei Viertelgemelksproben ab Zellzahlen von 500.000/ml ein deutlicher Anstieg der prozentualen Häufigkeit positiver bakteriologischer Befunde und nach HESS (1969) sind Milchproben mit entsprechenden Zellzahlen, unabhängig vom bakteriologischen Befund, in 96 % bis 98 % der Fälle mit histologisch sehr ausgeprägter Mastitis verbunden. Die besondere Bedeutung der Zellzahl als diagnostischem Kriterium liegt auch in seiner Variationsbreite. Nach REICHMUTH (1973) verhält sich die Variationsspanne im Bereich der gestörten Sekretion zu der im Bereich der normalen Sekretion etwa wie 1 : 5. Damit ist die Bestimmung des Zellgehaltes ein Leitkriterium zur Erfassung der Bereiche normaler wie gestörter Sekretion in Viertelgemelksproben und erlaubt außerdem bei Untersuchung von Sammelmilchproben einen Rückschluß auf die Mastitissituation in Herden (REICHMUTH, 1973) - mit ausreichender Sicherheit nach GLAWISCHNIG, NEUMEISTER und ALBANA (1971) allerdings erst nach Herabsetzung der Zellzahlgrenze für Kannenmilchproben auf 200.000/ml.

Zur Bestimmung des Zellgehaltes steht eine Reihe direkter und indirekter Untersuchungsverfahren zur Verfügung, deren Einsatzmöglichkeit von der erforderlichen Meßgenauigkeit, Beschaffenheit des Probenmaterials und wirtschaftlich organisatorischen Voraussetzungen abhängt. Die indirekten Verfahren zeichnen sich in der Regel durch leichte Anwendbarkeit und geringen technischen Aufwand aus, sollten jedoch bei Sammelmilchproben auf Grund methodischer und subjektiver Fehler nur Orientierungshilfe bei der Mastitisiagnostik sein (DEDL, 1960; BRODAUF und KRÜGER, 1962; RICHTER, KLEINSCHROTH, GRUBER und HAUGG, 1961; ASTERMARK, 1971 u. a.). Von den direkten Verfahren gilt auch heute noch die mikroskopische Auszählung nach PRESCOTT und BREED, trotz einer Reihe von Unsicherheiten, als Referenzmethode. In neuerer Zeit nimmt das EPZ breiten Raum ein und wird von verschiedenen Autoren (HAUKE, 1968; KLEINSCHROTH, RICHTER und SCHUMANN, 1968; KLEINSCHROTH, 1971) als die genaueste Methode zur Untersuchung größerer Milchprobenmengen angesehen. Eine weitergehende Automatisierung des Untersuchungsganges ermöglicht die OPZ in der kontinuierlichen Durchflußanalyse.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Einsatzmöglichkeit der OPZ mittels Auto-Analyzer II für Routineuntersuchungen zur Ermittlung des Gehaltes somatischer Zellen in Milch unter den Gesichtspunkten der Meßgenauigkeit und Wirtschaftlichkeit im Vergleich zum MZ und EPZ zu prüfen. Dazu war es zunächst erforderlich, für die OPZ vier verschiedene Aufbereitungsmethoden mit entsprechenden Reagenzien ('Clarification Reagent' und Verdünnungslösung nach TECHNICON bzw. HEESCHEN et al. Fertigreagenzien und Elektrolyt-Emulgator-Gemisch) hinsichtlich Aufwand und Meßgenauigkeit zu prüfen.

Diese Untersuchungen zeigen, daß die Verwendung des Elektrolyt-Emulgator-Gemisches wesentliche Vorteile gegenüber den anderen Methoden aufweist. Sowohl die Herstellung als auch die Aufbereitung der Proben dürften nach diesem Verfahren einem bisher mit dem EPZ vertrauten Laborpersonal keine Schwierigkeiten bereiten. Hingegen war die Präparation der von TECHNICON (1971 a) bzw. HEESCHEN et al. (1971, 1972) beschriebenen Reagenzien, besonders die des 'Clarification Reagent', bei den eigenen Untersuchungen häufig mit chemisch-physikalischen Fehlreaktionen verbunden (z. B. Bräunung der gesättigten methanolischen Kaliumhydroxydlösung). Auch waren sowohl Kosten- als auch Zeitaufwand und Bedarf an Gerätschaften wesentlich größer als bei der Herstellung des Elektrolyt-Emulgators. Hinzu kommt, daß bei Verwendung des 'Clarification Reagent' und der Verdünnungslösung nach TECHNICON eine Fixationslösung mit 4-fach höherem Formaldehydgehalt (2,8 mg/ml Milchprobe) vorgeschrieben ist, so daß die so behandelten Proben nicht gleichzeitig für das EPZ verwendet werden können. Zur Ermittlung des Einflusses der verschiedenen Reagenzien bei der OPZ auf die Meßgenauigkeit wurden Korrelationen zwischen MZ, EPZ und der OPZ errechnet. Bei Verwendung des 'Clarification Reagent' und der Verdünnungsflüssigkeit sowohl nach TECHNICON als auch nach HEESCHEN et al. (Flußschema Abb. 2) wurde zwischen EPZ und OPZ jeweils ein Korrelationskoeffizient von 0,89, bei Anwendung des Elektrolyt-Emulgator (Flußschema Abb. 3) ein solcher von 0,90 erreicht. Zwischen den Methoden zur OPZ und dem MZ bestehen mit 0,93 die besten Korrelationen bei Verwendung des 'Clarification Reagent' und der Verdünnungsflüssigkeit nach HEESCHEN et al., bzw. des Elektrolyt-Emulgators. Die geprüften Fertigreagenzien können nach den Ergebnissen dieser Untersuchungen nicht empfohlen werden, da einerseits die ermittelten Korrelationskoeffizienten (MZ : OPZ = 0,54; EPZ : OPZ = 0,55) deutlich schlechter sind, andererseits der hohe Preis eine Verwendung zur Untersuchung größerer Probenmengen ausschließt.

Die vergleichsweise guten Korrelationen zum EPZ, Preiswürdigkeit, geringer Arbeits- und Materialaufwand lassen nach den vorliegenden Untersuchungen den Elektrolyt-Emulgator für die OPZ als geeignet erscheinen. Damit werden die Untersuchungsergebnisse von HEESCHEN et al. (1971, 1972) bestätigt. Dagegen weichen die Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Zellzählverfahren von den von den genannten Autoren gefundenen, insbesondere zwischen MZ : EPZ und MZ : OPZ, ab. Die Ursache dafür dürfte, wie noch ausführlicher besprochen wird, in der beträchtlichen Fehlermöglichkeit des MZ liegen.

Eine Verkürzung der Fixierungsdauer der Milchproben auf 30 Min. bei 60° C im Wasserbad erwies sich der 24-stündigen Fixierung bei Zimmertemperatur als unterlegen. Aus diesem Grunde wurden die dem Ergebnisvergleich zwischen MZ, EPZ und OPZ zugrunde gelegten 650 Viertelgemelksproben für das EPZ und die OPZ (Elektrolyt-Emulgator) 24 Std. bei Zimmertemperatur fixiert.

Die bisher besprochenen Versuche waren Voraussetzung für den nun zu diskutierenden Methodenvergleich.

Die mikroskopische Auszählung nach PRESCOTT und BREED (als die eine Referenzmethode), die seit ihrer Veröffentlichung im Jahre 1910 kaum geändert wurde, ist eine in Anfertigung und Auswertung, besonders bei Reihenuntersuchungen, sehr aufwendige Methode, die zudem erhebliche Fehlermöglichkeiten beinhaltet. LEIDL, SCHALM und LÜPS (1961) und BAUMGARTNER (1965) schrieben diesbezüglich, daß die Gleichmäßigkeit der Verteilung der Zellen im Ausstrich sehr unterschiedlich sein kann, was bei Auszählung einer beschränkten Anzahl von Gesichtsfeldern zu einer Ergebnisungenauigkeit führen kann. TOLLE (1971) erwähnt, daß in Einzelfällen die Entscheidung, ob es sich bei den gefärbten Strukturen um Zellen handelt oder nicht, subjektiv beantwortet werden muß. Eine erhebliche methodisch bedingte Unschärfe liegt weiterhin in dem, je nach verwendetem Mikroskop, unterschiedlichen Multiplikationsfaktor - bei den eigenen Untersuchungen 40.000. Dies beinhaltet eine Erfassung der Zellgehalte nur in Bereichen von jeweils 40.000 Zellen/ml, während die Ablesegenauigkeit des EPZ und der OPZ wesentlich schärfer ist und im Bereich von 1.000 bzw. 10.000 Zellen/ml liegt. Bei niederen Zellzahlwerten ist dieses Fehlverhältnis der Erfassung im Vergleich zu den höheren Zellzahlwerten gespreizt, weshalb diese niedrigen Werte auf die Größe der Korrelationswerte zwischen MZ einerseits und EPZ bzw. OPZ andererseits verstärkt Einfluß nehmen.

Die bei den 650 Proben errechneten Korrelationen zwischen MZ : EPZ und MZ : OPZ von jeweils 0,90 sind signifikant, entsprechen jedoch nicht den von ZEIDLER, TOLLE und HEESCHEN (1968) bzw. HEESCHEN et al. (1971, 1972) angegebenen Werten von jeweils 0,97. Die Ursache hierfür ist meines Erachtens, wie bereits erwähnt, beim MZ zu finden. So geben auch TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN (1966) bei Auszählung von unabhängigen Parallelansätzen und Zellgehalten von 0 bis 500.000 Zellen/ml Korrelationen von 0,90 bzw. 0,86; Variationskoeffizienten von 25,51 % bzw. 29,29 % und mittlere Standardabweichungen bis 27.860 Zellen/ml an. Auch HAUKE (1968) betont die Unschärfe dieser Zählmethode und beurteilt sie als einen wenig geeigneten Maßstab zur Überprüfung neuerer direkter Zellzählmethoden.

Dem EPZ (zweite Referenzmethode) wird allgemein größere Meßgenauigkeit und bessere Reproduzierbarkeit bescheinigt. Voraussetzung dafür ist allerdings eine exakte Aufbereitung der Milchproben. In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, daß eine Abweichung von 10,0 ml zu fixierender Milchmenge ($\pm 2,0$ ml), wie sie bei Dosierung nach Augenmaß auftreten kann, eine hochsignifikante Auswirkung auf die Ergebnisse hat. Diese Fehlermöglichkeit gilt auch für die auf gleiche Weise fixierten Proben bei der OPZ. Zur Aufbereitung der Proben für die Inkubierung im Wasserbad wurden Mikroliter-Pipetten (Marburg) und ein Pipettierautomat überprüft. Die aus dieser Vergleichsuntersuchung resultierende Ergebnisabweichung betrug 2,5 %. Dies entspricht bei 500.000 Zellen/ml einer Differenz von 12.500 Zellen/ml. Für die Mikroliter-Pipetten sind insbesondere bei Massenuntersuchungen die subjektiven Fehlermöglichkeiten und die Personalbelastung größer, so daß das automatische Pipettiergerät aus diesen Gründen für die elektronische Partikelzählung praktikabel ist.

Die bei diesen Versuchen mitbestimmte Streuung des elektronischen Partikelzählgerätes lag mit 13,3 bzw. 7,2, also Werten von 13.300 bzw. 7.200 Zellen/ml in Bereichen, die eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleisten und die diesbezüglichen Angaben von KLEINSCHROTH, RICHTER und SCHUMANN (1968) bestätigen. DIJKMANN, SCHIPPER und WALSTRA (1966) bezeichneten sie als wesentlich besser, als die der direkten mikroskopischen Zählung.

Die von verschiedenen Autoren (KLEINSCHROTH, 1971; TOLLE, 1971) beschriebene externe Störanfälligkeit des Coulter Counter kann bestätigt werden. Für die OPZ konnten derartige Störungen nicht beobachtet werden, jedoch sollte die, zumindest bei dem für diese Untersuchungen verwendeten

Gerät, relativ hohe Reparaturanfälligkeit, besonders des "Cell Counters", nicht unerwähnt bleiben. Die mit der Festlegung des optimalen Schwellenwertes durch Bestimmung des Zählplateaus (Meßwerte als Summenverteilungskurve registriert) verbundenen Schwierigkeiten (TERPLAN und SCHLEYERBACH, 1967; TOLLE, 1971; BRUNOLD, 1972) wurden bei den hier beschriebenen Untersuchungen sowohl beim EPZ, als auch bei der OPZ beobachtet.

Für die Eichung beider Geräte wurde eine Standard-Leukozyten-Suspension verwendet, die im System der OPZ ohne spezielle Aufbereitung kontinuierlich zwischen den Milchproben mitlaufen kann und so eine stetige Kontrolle und eventuell nötige Nachkalibrierung des Systems erlaubt. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der OPZ kann bei der festgestellten mittleren Streuung, $S_e = 13,74$ (entspricht 13.740 Zellen/ml), als ausgezeichnet beurteilt werden. Eine Verbesserung wäre nur bei exakterer Ergebnisregistrierung (Erfassungsgenauigkeit bisher 10.000 Zellen/ml) denkbar.

Zwischen dem EPZ und der OPZ ergab sich bei den untersuchten Viertelgemelksproben ein Korrelationskoeffizient von 0,91. Damit werden die von HEESCHEN et al. (1971, 1972) erreichten signifikanten Beziehungen bestätigt. Es mag erstaunlich sein, daß diese Korrelation nicht wesentlich enger ist als die zwischen MZ einerseits und EPZ bzw. OPZ andererseits, obwohl die MZ doch mit einem erheblich höheren methodischen Fehler behaftet ist als die beiden anderen Verfahren. Der Grund dafür liegt im Wesen des Korrelationskoeffizienten begründet, indem systematisch bedingte Unterschiede zwischen zwei Verfahren, auch wenn diese numerisch groß sind, sich in engeren Korrelationen äußern, als Werte die weniger stark differenzieren, jedoch keine systematische Abhängigkeit voneinander haben. In dieser Hinsicht muß auch der Korrelationskoeffizient als Parameter für die vergleichende Bewertung von Verfahren diskutiert werden.

Zieht man hinsichtlich einer Gesamtbeurteilung der Eignung neben der Ergebnisübereinstimmung zwischen EPZ und OPZ ökonomische Kriterien heran, so zeigt sich, daß den höheren Anschaffungskosten des Auto-Analyzer II (65.989,50 DM brutto, verzollt; Coulter Counter "Modell F" 19.190,70 DM) die wesentlich geringeren Reagenzienkosten (1,50 DM gegen 4,60 DM für 100 Proben) gegenüberstehen. Eine eingearbeitete Laborkraft kann mit der OPZ ca. 600 Proben täglich bewältigen, während nach eigenen Erfahrungen für das EPZ bei gleichem Probenumfang zumindest zwei Laborkräfte für Aufbereitung und Zählung nötig sind. Wird die Probenfrequenz auf über 80/Std.

im Auto-Analyzer II gesteigert (bis 200/Std. möglich), so spricht dieser Aspekt noch deutlicher für die OPZ. Eine Steigerung bei dem zur Verfügung stehenden Gerät wurde wegen der daraus resultierenden Ableseungenauigkeit von kleineren Werten nach hohen Ergebnissen nicht vorgenommen. Bei hohen Ausschlägen des Zeigers bedarf es auf Grund der Anzeigeträgheit einer längeren Zeit bis der Schreiber die Basislinie wieder erreicht, so daß von diesem Peak eine darauffolgende Messung mit niedrigen Zellwerten verdeckt werden kann oder sich nur als "Schulter" äußert. Für Routineuntersuchungen, bei denen nur das Überschreiten eines gewissen Grenzwertes von Bedeutung wäre, würde dieser Fehler keine Rolle spielen. Sofern das geometrische Mittel aus mehreren Messungen beurteilt wird, müßte diesem Umstand jedoch Rechnung getragen werden.

Bei Berücksichtigung aller Faktoren und Kriterien bestehen nach diesen Untersuchungen keine prinzipiellen Bedenken gegen den Einsatz der OPZ zu Routineuntersuchungen. Die Vorteile dieser Methode liegen vor allem in Personaleinsparung, Ausschluß subjektiver Fehler durch die Bedienungsneutralität, guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, geringem Kostenaufwand pro Probe und Möglichkeit der ständigen Systemkontrolle durch kontinuierlich mitlaufende Standard-Suspensionen. Wirtschaftlichkeit des Einsatzes bei relativ hohem Anschaffungspreis des Gerätes ergibt sich aus der Eignung für die Massenuntersuchung (bis 200 Proben/Std.) und der parallelen Erfassung weiterer Parameter (z. B. Pyruvat, Laktat usw.), wobei bestimmte Einheiten dieses Analysensystems (z. B. Probennehmer, Proportionierpumpe und "Recorder") für verschiedene Kriterien gemeinsam genutzt werden können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das Verfahren der optischen Partikelzählung (OPZ) in der kontinuierlichen Durchflußanalyse zur Zählung somatischer Zellen in Milch geeignet ist. Hierzu wurden nach Vorversuchen zur Methodik die Ergebnisse mit denen des mikroskopischen Zählverfahrens (MZ) und des elektronischen Partikelzählverfahrens (EPZ) verglichen.

Zur Konservierung und Fixierung für EPZ und OPZ erwies sich die genaue Dosierung von 10,0 ml Milch als erforderlich. Eine Abweichung von ± 2 ml, wie sie bei Dosierung nach Augenmaß auftreten kann, hat signifikanten Einfluß auf die Ergebnisse. Die Verwendung des für das EPZ gebräuchlichen Elektrolyt-Emulgator-Gemisches erwies sich auch für die OPZ hinsichtlich Meßgenauigkeit, Präparations- und Kostenaufwand als optimal.

Die anhand von 650 Viertelgemelksprobenuntersuchungen zwischen MZ einerseits und OPZ bzw. EPZ andererseits ermittelten Korrelationskoeffizienten von je $r = 0,90$, sowie derjenige zwischen EPZ und OPZ von $r = 0,91$ sind signifikant und bestätigen die Eignung der OPZ für die Bestimmung des Gehaltes somatischer Zellen in Milch. Aus der weitgehenden Automatisierung des Untersuchungsganges bei diesem Verfahren ergaben sich vor allem gegenüber dem MZ folgende Vorteile: Hohe Ergebnisreproduzierbarkeit durch den Ausschluß subjektiver Fehlerquellen, ständige Systemkontrolle durch regelmäßig mitlaufende Standard-Leukozyten-Suspensionen, sowie vergleichsweise geringe Arbeits- und Kostenbelastung bei Massenuntersuchung.

Summary

The composition in question investigates the problem whether the method of optical cell count (OPZ) in the continual flow-through analysis is suited for the determination of the content of somatic cells in milk. After preparatory investigations on the methods, the results obtained with this kind of method have been compared with those obtained in the microscopic cell count (MZ) and those in the electronic cell count (EPZ).

For the purpose of conservation and fixation of EPZ and OPZ an exact dosage of an amount of 10.0 milli-liter of milk proved to be necessary. A deviation of 2 milli-liter as possible by a dosage according to estimate by the eye, has a significant influence on the results. The use of the emulgator electrolyte solution, which is usual for the EPZ method, proved to be satisfactory for the OPZ method, too, with regard to accuracy of measuring, amount of preparation and expenses.

The correlation coefficients, determined by means of 650 analysis tests of quarter milking specimens, between MZ on the one hand and OPZ and EPZ respectively on the other hand amounted to $r = 0.90$ und to $r = 0.91$ as between EPZ and OPZ; they are significant and verify the suitability of the OPZ method for the determination of the amount of somatic cells in milk. Due to extensive use of automatizing the process of examination in this method the following advantages, above all against the MZ method, have been achieved: a high reproductability of results on account of avoiding subjective sources of errors, a constant control of system by means of regularly parallel running suspensions of standard leukocytes as well as a comparatively low amount of work and expenses.

6. SCHRIFTTUM

ASTERMARK, S. (1971):

Verhältnis zwischen California-Mastitis-Test (CMT), Whiteside-Test (WsT), Brabant-Mastitis-Reaktion (BMR), Catalese-Test (CT) und der direkten Zählung der Zellen in der Milch (CC).

"Der praktische Tierarzt" 52, 227.

BAUMGARTNER, H. (1965):

Eine wenig beachtliche Fehlerquelle bei der Zellbestimmung der Milch. Milchwiss. 20, 351 - 353.

BAUMGARTNER, H., und E. HUBER (1971):

Die Zellzahl der Milch in den einzelnen Gemelksfraktionen von eutergesunden und euterkranken Kühen.

Alimenta Sondernummer 1971, 63 - 66.

BRANDER, G.C. (1971):

Mastitis control.

Jr. veter. J. 25, 222 - 228.

BRODAUF, H., und W. KRÜGER (1961):

Ein Beitrag zur Verwendung des Schalm-Mastitis-Testes.

Tierärztl. Umschau 16, 37 - 39.

BRUNOLD, K. (1972):

Über die elektronische Zählung der Zellen in Milch mit dem Coulter Counter "Modell F".

Vet. med. Diss. München.

CULLEN, G.A. (1965):

The use of electronic counters for determining the number of cells in milk.

Vet. Rec. 77, 858.

DEDIÈ, K. (1960):

Erfahrungen mit der California-Mastitis-Probe.

Tierärztl. Umschau 15, 153 - 154.

DIERNHOFER, K. (1950):

Diagnostik der Euterentzündungen.

Wien. tierärztl. Mschr. 37, 809 - 866.

DIJKMAN, A.J., C.J. SCHIPPER und P. WALSTRA (1966):

Voorlopige mededeling over de toepassing van de "Coulter Counter" voor de bepaling van het celgehalte van melk. (Vorläufige Mitteilung über den Gebrauch des "Coulter Counter" bei der Bestimmung des Zellgehaltes der Milch.)

Neth. Milk & Dairy J. 20, 193 - 203.

GLAWISCHNIG, E., E. NEUMEISTER und A. SABRI ALBANA (1971):

Die wichtigsten Maßnahmen zur wirksamen Bekämpfung der Euterinfektionen in größeren Kuhbeständen.

Wien. tierärztl. Mschr. 58, 127 - 131.

GUTHY, K., W. GEDEK, F. KIERMEIER, H. STEINBRECHER und A. PROBST (1970):

Untersuchungen zur Eutergesundheit von Kühen aus einem Molkerei-Einzugsgebiet in Bayern.

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 83, 1 - 7.

HAUKE, H. (1961):

Zellgehalt der normalen und pathologisch veränderten Milch.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 68, 660 - 664 und 724 - 727.

derselbe (1969):

Die Bestimmung des Zellgehaltes der Milch mit Hilfe des elektronischen Teilchenzählgerätes TuR ZG 1.

Mhefte Vet. med. 24, 102 - 107.

HEESCHEN, W. (1966):

Die Eignung des Brabanter-Mastitis-Testes zur Erfassung von Mastitiden und Sekretionsstörungen.

"Der praktische Tierarzt" 47, 250.

HEESCHEN, W., A. TOLLE, J. REICHMUTH und H. ZEIDLER (1971):
Die Zählung somatischer Zellen in Milch.
Technicon Symposium, Sonderdruck 963.

dieselben (1972):

Die automatisierte Zählung somatischer Zellen der Milch in der kontinuierlichen Durchflußanalyse.

Milchwiss. 27, 745 - 750.

HESS, E. (1969):

Diskussionsbeitrag.

Proceedings 5. Symposium, W.A.V.F.H.

Opatija Jugoslaviens, 418 - 419.

JAARTSVELD, F.H.J. (1962):

De uitvoering en de waarde van de BMR (brabantse mastitis reactie) bij een georganiseerde mastitis-bestrijding. (Über die Ausführung und den Wert der BMR für eine organisierte Mastitis-Bekämpfung.)

Tschr. diergeneesk. 87, 1069 - 1077.

JOHST, F. (1971):

Großversuche zur Einsatzmöglichkeit elektronischer Teilchenzählgeräte bei der Qualitätsbestimmung der Rohmilch.

Mhefte Vet. med. 26, 85 - 91.

KAISER, E. (1965):

Untersuchungen über den Zellgehalt der Kuhmilch im Altmelkstadium.

Vet. med. Diss. München.

KALLER, H. (1964):

Vergleichende Untersuchungen bei Viertelgemelksproben mit fünf verschiedenen Zellzählverfahren zur Ermittlung von Sekretionsstörungen der Milchdrüse beim Rind.

Vet. med. Diss. München.

KLEINSCHROTH, E. (1971):

Erfahrungen mit neuen Methoden zur zytologischen, bakteriologischen und hemmstoff-biologischen Untersuchungen der Rohmilch.

Sonderdruck aus "molkereitechnik" Band 22.

KLEINSCHROTH, E., O. RICHTER und H. SCHUMANN (1968):

Die Anwendung der elektronischen Bestimmung des Milchzellgehaltes im Eutergesundheitsdienst und bei der Qualitätsüberwachung der Milch.

Milchwiss. 23, 147 - 153.

KOWALCZYK, ST. (1962):

zit. nach SEELEMANN, M. (1964):

Über den Zellgehalt der Milch, seine Feststellung, Bedeutung und Beurteilung.

Milchwiss. 19, 182 - 194.

LEIDL, W., O.W. SCHALM, A. KRIEGER und H. LAGEMANN (1961):

Vergleich des Schalm-Mastitis-Testes mit dem Zellgehalt der Katalase-Thyromol-Probe und dem Chlorgehalt in der Milch.

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 74, 382 - 384.

LEIDL, W., O.W. SCHALM und P. LÜPS (1961):

Die Zellzahlbestimmung in der Milch nach Prescott und Breed und ihre Fehlermöglichkeiten.

Milchwiss. 16, 557 - 565.

MURPHY, J.M., und J.J. HANSON (1941):

A modified Whiteside Test for the detection of chronic bovine mastitis.

Cornell Vet. 31, 47 - 55.

OBIGER, G. (1967):

Der Wert des Whiteside-Testes im Rahmen der Mastitis-Diagnose.

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 70, 290 - 292.

PAAPE, M.J., H. A. TUCKER und H.D. HAFS (1965):

Comparison of methods for estimating milk somatic cells.

J. Dairy Sci. 48, 191 - 196.

PHIPPS, L.W., und F.H.S. NEWBOULD (1965):

Isolation and electronic counting of leucocytes in cow's milk.

Vet. Rec. 77, 1377 - 1379.

dieselben (1966):

Determination of leucocyte concentrations in cow's milk with a Coulter counter.

J. Dairy Res. 33, 51 - 64.

PRESCOTT, S.C., und R.S. BREED (1910):

The determination of the number of body cells in milk by a direct method.

J. Infect. Dis. 7, 632 - 640.

READ, R.B., A.L. REYES, J.G. BRADSHAW und J.T. PELLER (1966):

Electronic counting of somatic cells in milk.

J. Dairy Sci. 49, 704.

REICHMUTH, J. (1973):

Zum zytologischen und biochemischen Profil der Milch unter dem Aspekt eines Konzeptes zur Mastitisbekämpfung.

Arbeitstagung der Deutschen Gesellschaft für Milchwissenschaft (München 10. - 11. April).

REICHMUTH, J., H. ZEIDLER, A. TOLLE und W. HEESCHEN (1970):

Zum Einfluß subklinischer Mastitiden auf die Milchleistung des Rindes.

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 83, 26 - 29.

RICHTER, O., E. KLEINSCHROTH, R. GRUBER und G. HAUGG (1961):

Erfahrungen mit dem Schalm-Test bei der Kannenmilchuntersuchung im Rahmen der Eutergesundheitskontrolle.

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 74, 127 - 130.

SCHALM, O.W., E.J. CARROLL und N.C. JAIN (1971):

Bovine Mastitis.

Verlag: Lea & Febiger, Philadelphia.

SCHULTZE, W.D. (1971):

Die Prüfung eines optischen Zellzählgerätes zur Messung somatischer Zellen in Milch.

Milchwiss. 26, 423.

SCHULZE - PETZOLD:

zit. nach HAUKE, H. (1961):

Zellgehalt der normalen und pathologisch veränderten Milch.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 68, 660 - 664 und 724 - 727.

SEELEMANN, M., und G. OBIGER (1962):

Symposium der Fachgemeinschaft Milchhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (Mastitis).

Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsber. 14, 265 - 284.

SEELEMANN, M., und A. MEYER (1963):

Über einige Verfahren zur Feststellung des Zellgehaltes in der Milch und ihren Wert für die Diagnose von Sekretionsstörungen.

Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsber. 15, 179 - 205.

STAHLHUTH - KLIPP, H. (1973):

Beziehungen zwischen der Anzahl somatischer Zellen und dem Lactosegehalt in Viertelgemelken.

Arbeitstagung der Deutschen Gesellschaft für Milchwissenschaft (München 10. - 11. April).

TECHNICON (1967):

Automation in the clinical laboratory.

Technicon Instruments Corporation/Tarrytown, New York.

derselbe (1971 a):

Technical Publication No. TA 1 - 0276 - 00.

derselbe (1971 b):

Auto-Analyzer II

derselbe (1971 c):

Technicon's Auto-Analyzer II system for milk analysis.

TEMPLE, H.C. (1963):

The modified Whiteside Test recommended procedures for bulk or blendet milk deliveries.

Cornell Vet. 53, 54 - 59.

TERPLAN, G. (1969):

Bakteriologische Probleme bei der Milcherzeugung.
Deutsches Tierärzteblatt 17, 589 - 594.

derselbe (1971):

Milchproduktion und Milchhygiene.
"Der praktische Tierarzt" 52, 497 - 499.

TERPLAN, G., und R. SCHLEYERBACH (1967):

Untersuchungen zu elektronischer Zellzählbestimmung, Brabanter-Mastitis-Reaktion, Whiteside-Mastitis-Test und Labgerinnungszeit der Milch.
Arch. Lebensmittelhyg. 18, 195 - 201.

TERPLAN, G., und K. -J. ZAADHOF (1969):

Zur diagnostischen und lebensmittelhygienischen Bedeutung von Staphylococcus aureus in Kuhmilch.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 76, 217 - 221.

THOMPSON, D. J. und D. S. POSTLE (1964):

The Wisconsin mastitis test - an indirect estimation of leucocytes in milk.
J. Milk Fd. Tech. 27, 271 - 275.

THORNTON, D. A. K. (1971):

The practitioner's role in mastitis control.
Control of bovine mastitis. N.I.R.D., Reading, England.

TOLLE, A. (1969):

Über den Einfluß von Mastitiden und Sekretionsstörungen auf die Qualität der Milch.
Proceedings 5. Symposium, W. A. V. F. H.
Opatija Jugoslavien, 331 - 357.

derselbe (1970):

Zur zytologischen, biochemischen und bakteriologischen Beurteilung von Milch.
Schweizer Archiv für Tierheilkunde 112, 512 - 533.

TOLLE, A. (1971):

Grundlagen für eine systematische Mastitis-Bekämpfung.

Teil I: Ätiologie, Bedeutung und Diagnostik.

Aus dem Institut für Milchhygiene der Bundesanstalt für MilCHForschung in Kiel.

TOLLE, A., H. ZEIDLER und W. HEESCHEN (1966):

Ein Verfahren zur elektronischen Zählung von MilChzellen.

Milchwiss. 21, 93 - 98.

WESTGARTH, D.R. (1971):

Interpretation of bulk cell count data.

Control of bovine mastitis. 105 - 111.

N.I.R.D., Reading, England.

WHITESIDE, W.H. (1939):

Observations on a new test for the presence of mastitis in milk.

Canad. J. Publ. Health 30, 44.

ZEIDLER, H., A. TOLLE und W. HEESCHEN (1968):

Verbesserte Präparationstechnik zur elektronischen Bestimmung des Zellgehaltes in Milch.

Milchwiss. 23, 564 - 568.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. TERPLAN für die freundliche Überlassung des Themas.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. J. DENEKE für seine jederzeit gewährte Unterstützung.

Außerdem danke ich Herrn Dr. M. J. THOMAS für die Anleitung und Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

LEBENS LAUF

Am 20. 9. 1945 wurde ich, Karl Stelzer, als Sohn des Kaufmanns Karl Stelzer und seiner Ehefrau Olga, geb. Fuchsgruber, in Landau a. d. Isar geboren.

Ab September 1951 besuchte ich die Volksschule in Landau a. d. Isar. Im Juli 1966 schloß ich meine Schulzeit mit der Reifeprüfung am Ludwigsgymnasium in Straubing ab. Im Wintersemester 1966/67 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München mein veterinär-medizinisches Studium, das ich am 22. März 1972 mit dem Staatsexamen abschloß. Seit August 1972 war ich mit meiner Doktorarbeit am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch beschäftigt.

